remel

GRAM CRYSTAL VIOLET (English)

INTENDED USE
Remel Gram Crystal Violet is a reagent recommended for use in qualitative procedures to differentiate gram-negative from gram-positive organisms.

SUMMARY AND EXPLANATION
The Gram stain method was developed in 1884 by the Danish bacteriologist, Christian Gram, to differentiate bacterial cells from infected tissue.[1] Later it was discovered that the bacterial cell wall composition was the key to the Gram stain and would differentiate bacteria into two groups based on cell color after staining. Since that time there have been many modifications of the original technique.[2,3]

PRINCIPLE
The primary stain is crystal violet, a basic dye taken up by all bacteria due to its ability to rapidly permeate the cell wall. It stains the protoplast of bacteria purple. The potassium-iodine mixture is the mordant which complexes with the primary stain in the cell. In gram-positive cells, the crystal violet-iodine complex is trapped in the cell due to a decrease in cell wall permeability caused by alcohol dehydration. Gram-positive cells are stained purple. In gram-negative cells, the complex is removed by the decolorizer due to an increase in permeability caused by solubility of the lipids in alcohol. The counterstain used must be a contrasting color to the primary stain and, in this case, it is safranin which stains gram-negative cells red.

REAGENTS (CLASSICAL FORMULA)*

Crystal Violet (CAS 548-62-9)	20.0 g
Ammonium Oxalate (CAS 6009-70-7)	8.0 g
Ethyl Alcohol 95% (CAS 64-17-5)	200.0 ml
Demineralized Water (CAS 7732-18-5)	800.0 ml

*Adjusted as required to meet performance standards.

PRECAUTIONS
Warning! Flammable liquid and vapor. May cause eye, skin, and respiratory tract irritation. May cause central nervous system depression. May cause liver and kidney damage. May cause reproductive and fetal effects. The toxicological properties of this material have not been fully investigated.

This product is for *In Vitro* diagnostic use and should be used by properly trained individuals. Precautions should be taken against the dangers of microbiological hazards by properly sterilizing specimens, containers, and media after use. Directions should be read and followed carefully. Refer to Material Safety Data Sheet for additional information.

STORAGE
This product is ready for use and no further preparation is necessary. Store product in its original container at 20-25°C until used.

PRODUCT DETERIORATION
This product should not be used if (1) the color has changed from purple, (2) the expiration date has passed, or (3) there are other signs of deterioration.

SPECIMEN COLLECTION, STORAGE, AND TRANSPORT
Specimens should be collected and handled following recommended guidelines.[4,5]

MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED
(1) Loop sterilization device, (2) Inoculating loop, swabs, collection containers, (3) Incubators, alternative environmental systems, (4) Supplemental media, (5) Quality control organisms, (6) Gram Iodine (R40056), (7) Gram Decolorizer (R40054), (8) Gram Safranin (R40058), (9) Glass slides, (10) Bunsen burner or slide warmer, (11) Microscope, immersion oil, (12) Staining rack, (13) Methanol (optional).

PROCEDURE
1. Make a thin smear of the material for study on a glass slide. Allow the slide to air-dry completely or use a slide warmer. Fix the slide by passing 3 or 4 times through the flame of a Bunsen burner or flood the smear with methanol and allow it to evaporate.
2. Place the slide on a staining rack and overlay with Gram Crystal Violet for 1 minute.
3. Wash thoroughly with water and overlay with Gram Iodine mordant for 1 minute.
4. Flood with Gram Decolorizer until the solvent flows colorless from the slide (10-30 seconds).
5. Rinse with water and overlay with Gram Safranin for 30 seconds.
6. Rinse with water and allow to dry.

INTERPRETATION
Gram-positive organisms stain purple.
Gram-negative organisms stain red.

QUALITY CONTROL
All lot numbers of Gram Crystal Violet have been tested and found to yield acceptable stain results as listed in the **Interpretation** section. Positive and negative control slides should be tested prior to use of new lot numbers of stains and decolorizing reagent and at least weekly thereafter. If aberrant quality control results are noted, patient results should not be reported.

LIMITATIONS
1. Test positive and negative controls with each new lot number of stains and weekly thereafter to verify reagent efficacy and ensure that decolorization procedure is performed correctly.[5]
2. To obtain the most reliable results, remove clinical specimen isolates from an 18-24 hour culture growing on nonselective medium.[5]
3. Do not overheat smears when fixing slides. Excessive heating will cause atypical staining.[5,6]
4. Gram-positive organisms contained in a specimen may appear gram-negative if the patient is on antimicrobial therapy.[5]
5. Precipitated crystal violet can appear as coccoid shapes or fungal elements, as well as other artifacts or background material.[5]

BIBLIOGRAPHY

1. Bartholomew, J.W. and T. Mittwer. 1952. Bacteriol. Rev. 16:1-29.
2. Mittwer, T., J.W. Bartholomew, and B.J. Kallman. 1950. Stain Technol. 25:169-179.
3. Bartholomew, J.W. and T. Mittwer. 1951. Stain Technol. 26:231-240.
4. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2007. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Mosby Elsevier, St. Louis, MO.
5. Garcia, L.S. 2010. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3rd ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. Mangels, J.I., M.E. Cox, and L.H. Lindberg. 1984. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2:129-137.

PACKAGING

REF R40052, Gram Crystal Violet	250 ml/Btl
REF R40053, Gram Crystal Violet	250ml/Btl, 5/Pk
REF R40073, Gram Crystal Violet	Gallon

Symbol Legend

REF	Catalog Number
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device
LAB	For Laboratory Use
	Consult Instructions for Use (IFU)
	Temperature Limitation (Storage Temp.)
LOT	Batch Code (Lot Number)
	Use By (Expiration Date)
EC REP	Authorized European Representative
	Manufacturer

12076 Santa Fe Drive
Lenexa, KS 66215, USA
www.remel.com
(800) 255-6730
International: (913) 888-0939

EC REP
Remel Europe Ltd.
Clipper Boulevard West, Crossways
Dartford, Kent, DA2 6PT, UK

For technical information contact your local distributor.
CAS (Chemical Abstracts Service Registry No.)
Manufactured for Remel Inc.

CE

IFU 40052, Revised January 3, 2014 Printed in the U.S.A.

remel

GRAM CRYSTAL VIOLET (Deutsch)

ANWENDUNGSBEREICH
Remel Gram Crystal Violet ist ein für qualitative Verfahren zur Unterscheidung gram-negativer von gram-positiven Organismen empfohlenes Reagens.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG
Die Gram-Färbung wurde 1884 von dem dänischen Bakteriologen Christian Gram entwickelt, um verschiedene Bakterienzellen von infiziertem Gewebe unterscheiden zu können.[1] Später wurde dann festgestellt, dass die Gram-Färbung durch die Zusammensetzung der bakteriellen Zellwand zustande kommt und die Bakterien entsprechend der Anfärbung in zwei Gruppen eingeteilt werden können. Seitdem ist das ursprüngliche Verfahren mehrfach abgewandelt worden.[2,3]

TESTPRINZIP
Das primäre Färbemittel ist Kristallviolett, ein basischer Farbstoff, der sehr schnell die Zellwand durchdringt und dadurch von allen Bakterien aufgenommen wird. Kristallviolett färbt die Protoplasten von Bakterien purpurrot. Als Beizmittel wird eine Kalium-Jod-Mischung verwendet, die mit dem primären Farbstoff in den Zellen einen Komplex bildet. In gram-positiven Zellen kommt es aufgrund von Alkoholdehydrierung zu einer Verminderung der Zellwandpermeabilität, wodurch der Kristallviolett-Jod-Komplex in der Zelle verbleibt. Gram-positive Zellen werden purpurrot angefärbt. In gram-negativen Zellen kommt es aufgrund der Löslichkeit von Lipiden in Alkohol zu einem Anstieg der Zellwandpermeabilität, wodurch der Komplex von dem Entfärbemittel entfernt wird. Die verwendete Gegenfärbung muss eine Kontrastfarbe zur primären Färbung hervorbringen. In diesem Fall ist Safranin der Farbstoff, der die gram-negativen Zellen rot färbt.

REAGENZIEN (KLASSISCHE REZEPTUR)*

Kristallviolett (CAS 548-62-9)	20,0 g
Ammoniumoxalat (CAS 6009-70-7)	8,0 g
Ethanol 95 % (CAS 64-17-5)	200,0 ml
Vollentsalztes Wasser (CAS 7732-18-5)	800,0 ml

*An die Erfüllung der jeweiligen Leistungsstandards angepasst.

VORSICHTSMASSNAHMEN
Achtung! Flüssigkeit und Dämpfe sind entflammbar. Kann Reizungen von Augen, Haut und Atemwegen auslösen. Kann das Zentralnervensystems beeinträchtigen. Kann Leber und Nieren schädigen. Kann die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen und Föten schädigen. Die toxikologischen Eigenschaften dieser Substanz wurden noch nicht vollständig untersucht.

Dieses Produkt ist für die Verwendung in der *In-vitro*-Diagnostik bestimmt und darf nur von entsprechend geschulten Personen verwendet werden. Mikrobiologischen Gefahren sollte vorgebeugt werden, indem Proben, Behälter und Transportmedien nach Gebrauch sterilisiert werden. Die Gebrauchsanweisung muss sorgfältig gelesen und genau befolgt werden. Zusätzliche Informationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt.

LAGERUNG
Dieses Produkt ist ohne weitere Vorbereitung gebrauchsfertig. Es sollte in seinem Originalbehälter bei 20-25°C bis zum Gebrauch aufbewahrt werden.

BEEINTRÄCHTIGUNG DER PRODUKTQUALITÄT
Dieses Produkt darf (1) bei Veränderung der purpurroten Farbe, (2) beim Überschreiten des Verfallsdatums und (3) beim Auftreten anderer Anzeichen eines Qualitätsverlusts nicht mehr verwendet werden.

PROBENENTNAHME, LAGERUNG UND TRANSPORT
Die Probenentnahme und -handhabung sollte nach den folgenden empfohlenen Richtlinien erfolgen.[4,5]

BENÖTIGTE MATERIALIEN (NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN)
(1) Gerät zur Sterilisation der Inokulationsschlinge, (2) Inokulation-sschlinge, Abstrichbesteck, Probenbehälter, (3) Inkubatoren, andere Klimasysteme, (4) zusätzliche Transportmedien, (5) Qualitätskontroll-organismen, (6) Gram Iodine (R40056), (7) Gram Decolorizer (R40054), (8) Gram Safranin (R40058), (9) Glas-Objektträger, (10) Bunsenbrenner oder Objektträgerheizgerät, (11) Mikroskop, Immersionsöl, (12) Färbegestell, (13) Methanol (optional).

VERFAHREN
1. Das zu untersuchende Material auf einem Glas-Objektträger dünn ausstreichen. Die Objektträger an der Luft vollständig trocknen lassen bzw. ein Objektträgerheizgerät verwenden. Objektträger fixieren. Dazu 3 oder 4 Mal durch die Flamme eines Bunsen-brenners ziehen oder den Ausstrich mit Methanol tränken und anschließend verdunsten lassen.
2. Objektträger in ein Färbegestell einsetzen und eine Minute lang in Gram Crystal Violet eintauchen.
3. Gründlich mit Wasser auswaschen und eine Minute in Beizmittel Gram Iodine eintauchen.
4. Gram Decolorizer hinzugeben, bis die Farbe vom Objektträger abgelöst ist (10-30 Sekunden).
5. Gründlich mit Wasser spülen und 30 Sekunden in Gram Safranin eintauchen.
6. Mit Wasser abspülen und trocknen lassen.

INTERPRETATION
Gram-positive Organismen werden purpurrot angefärbt.
Gram-negative Organismen werden rot angefärbt.

QUALITÄTSKONTROLLE
Alle Chargen des Gram Kristallviolett wurden geprüft und für tauglich befunden, akzeptable Färbeergebnisse zu erzeugen, wie sie in Abschnitt **Interpretation** aufgeführt sind. Positive und negative Kontroll-Objektträger sollten vor der Verwendung neuer Chargen von Farbstoffen und Entfärbereagenz sowie anschließend mindestens wöchentlich getestet werden. Treten im Rahmen der Qualitätskontrolle abweichende Ergebnisse auf, dürfen die Patientenergebnisse nicht verwendet werden.

BESCHRÄNKUNGEN
1. Positive und negative Kontrollen bei jeder neuen Charge des Färbemittels und eine Woche danach testen, um die Wirksamkeit des Reagens zu bestätigen und um zu gewährleisten, dass das Entfärbeverfahren ordnungsgemäß durchgeführt wird.[5]
2. Die zuverlässigsten Ergebnisse werden erreicht, wenn Isolate aus klinischen Proben einer 18-24 Stunden alten Kultur auf einem nicht-selektiven Medium wachsen.[5]
3. Beim Fixieren die Objektträger nicht überhitzen. Übermäßige Erwärmung führt zu atypischen Färbeergebnissen.[5,6]
4. In einer Probe enthaltene gram-positive Organismen können als gram-negativ erscheinen, wenn der Patient Antibiotika einnimmt.[5]
5. Präzipitiertes Kristallviolett kann als kokkoide Formen oder Pilzelemente, aber auch als andere Artefakte oder Backgroundmaterial erscheinen.[5]

LITERATURANGABEN

1. Bartholomew, J.W. and T. Mittwer. 1952. Bacteriol. Rev. 16:1-29.
2. Mittwer, T., J.W. Bartholomew, and B.J. Kallman. 1950. Stain Technol. 25:169-179.
3. Bartholomew, J.W. and T. Mittwer. 1951. Stain Technol. 26:231-240.
4. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2007. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Mosby Elsevier, St. Louis, MO.
5. Garcia, L.S. 2010. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3rd ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. Mangels, J.I., M.E. Cox, and L.H. Lindberg. 1984. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2:129-137.

PACKUNGSGRÖSSE

REF R40052, Gram Crystal Violet	250 ml/Fläschchen
REF R40053, Gram Crystal Violet	250 ml/Fläschchen; 5/Packg.
REF R40073, Gram Crystal Violet	1 Gallone

Symbollegende

REF	Katalognummer
IVD	In-vitro-Diagnostikum
LAB	Für Laborgebrauch
	Gebrauchsanweisung beachten
	Temperaturbeschränkungen (Lagerungstemp.)
LOT	Chargencode (Losnummer)
	Verfallsdatum
EC REP	Autorisierte Vertretung für U-Länder
	Hersteller

12076 Santa Fe Drive
Lenexa, KS 66215, USA
www.remel.com
(800) 255-6730
International: (913) 888-0939

EC REP
Remel Europe Ltd.
Clipper Boulevard West, Crossways
Dartford, Kent, DA2 6PT, UK

Bei technischen Fragen wenden Sie sich bitte an Ihren zuständigen Vertriebspartner.

CAS (Chemical Abstracts Service).
Hergestellt für Remel Inc.

CE

IFU 40052, Überarbeitete Fassung vom 2014-01-03 Printed in the USA.

remel

GRAM CRYSTAL VIOLET (Français)

APPLICATION
Le violet de gentiane (ou cristal violet) pour coloration de Gram de Remel est un réactif recommandé dans le cadre des procédures qualitatives pour différencier les organismes à Gram négatif des organismes à Gram positif.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION
La coloration de Gram doit son nom au bactériologiste danois, Christian Gram, qui mit au point le protocole en 1884 pour différencier les cellules bactériennes des tissus infectés.[1] Par la suite, on a découvert que la composition de la paroi des cellules bactériennes expliquait la coloration de Gram et permettait de différencier les bactéries en deux groupes selon la couleur de la cellule après coloration. Depuis, cette technique a connu de nombreuses modifications.[2,3]

PRINCIPE
Le violet de gentiane (ou cristal violet) sert de colorant principal ; il s'agit d'un colorant basique absorbé par toutes les bactéries en raison de son aptitude à pénétrer rapidement à travers la paroi cellulaire. Il colore le cytoplasme des bactéries en violet. Le mordançage s'effectue grâce à un mélange d'iode et de potassium qui forme un complexe avec le colorant principal présent dans la cellule. Dans les cellules à Gram positif, le complexe violet de gentiane-iode est piégé à l'intérieur de la cellule en raison d'une diminution de la perméabilité de la paroi cellulaire provoquée par une déshydratation produite par de l'alcool. Les cellules à Gram positif sont colorées en violet. Dans les cellules à Gram négatif, le complexe est éliminé grâce à un décolorant en raison de l'augmentation de la perméabilité provoquée par la solubilité des lipides dans l'alcool. Le contre-colorant utilisé doit être d'une couleur contrastante par rapport au colorant principal, dans ce cas précis, il s'agit de la safranine qui colore les cellules à Gram négatif en rouge.

RÉACTIFS (FORMULE CLASSIQUE)*

Violet de gentiane (CAS 548-62-9)	20,0	g
Oxalate d'ammonium (CAS 6009-70-7)	8,0	g
Alcool éthylique à 95% (CAS 64-17-5)	200,0	ml
Eau déminéralisée (CAS 7732-18-5)	800,0	ml

*Avec compensations éventuelles pour satisfaire les normes de performance.

PRÉCAUTIONS
Avertissement! Liquide et vapeurs inflammables. Risque d'irritation de la peau, des yeux et des voies respiratoires. Possibilité de dépression du système nerveux central. Atteintes possibles du foie et des reins. Effets éventuels sur la reproduction et le fœtus. Les propriétés toxicologiques de ce produit ne sont pas totalement connues.

Ce produit, exclusivement destiné à un usage diagnostique in vitro, ne doit être utilisé que par des personnes dûment formées. Il faut prendre toutes les précautions contre les risques microbiologiques et il est indispensable de bien stériliser les prélèvements, les récipients et les milieux après usage. Il faut lire attentivement les instructions et les respecter scrupuleusement. Pour de plus amples renseignements, consulter la fiche de données de sécurité.

CONSERVATION
Ce produit est prêt à l'emploi ; aucune préparation supplémentaire n'est nécessaire. Conserver ce produit dans son flacon d'origine entre 20-25°C jusqu'à son utilisation.

DÉTÉRIORATION DU PRODUIT
Ce produit ne doit pas être utilisé si (1) la couleur violette a changé, (2) la date de péremption est dépassée ou (3) d'autres signes de détérioration sont présents.

RECUEIL, CONSERVATION ET TRANSPORT DES PRÉLÈVEMENTS
Les prélèvements doivent être recueillis et manipulés conformément aux recommandations en vigueur.[4,5]

MATÉRIEL REQUIS, MAIS NON FOURNI
(1) Dispositif de stérilisation pour anses, (2) Anse à inoculation (anse de platine), écouvillons, récipients de prélèvement, (3) Incubateurs, autres systèmes environnementaux, (4) Milieux supplémentés, (5) organismes de contrôle de qualité, (6) Iode pour coloration de Gram (R40056), (7) Décolorant pour coloration de Gram (R40054), (8) Safranine pour coloration de Gram (R40058), (9) Lames de verre, (10) Bec Bunsen ou platine chauffante, (11) Microscope, huile à immersion, (12) Portoir à coloration, (13) Méthanol (optionnel).

PROCÉDURE
1. Réaliser un étalement fin (frottis) du matériau à étudier sur une lame de verre. Laisser la lame sécher complètement à l'air libre ou utiliser une platine chauffante. Fixer la lame en la passant 3 ou 4 fois au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen ou recouvrir jusqu'à débordement le frottis de méthanol et laisser évaporer.
2. Placer la lame sur un portoir à coloration et recouvrir de violet de gentiane pour coloration de Gram pendant 1 minute.
3. Rincer soigneusement à l'eau et recouvrir de mordant, iode pour coloration de Gram, pendant 1 minute.
4. Recouvrir jusqu'à débordement avec le décolorant pour coloration de Gram jusqu'à ce que le solvant s'écoule en un filet clair de la lame (10 à 30 secondes).
5. Rincer à l'eau et recouvrir de safranine pour coloration de Gram pendant 30 secondes.
6. Rincer à l'eau et laisser sécher.

INTERPRÉTATION
Les organismes à Gram positif sont colorés en violet.
Les organismes à Gram négatif sont colorés en rouge.

CONTRÔLE DE QUALITÉ
Tous les numéros de lots du violet de gentiane pour coloration de Gram ont été testés et reconnus comme offrant des résultats de coloration acceptables, comme l'indique la section **Interprétation**. Les lames de contrôle, positive et négative, doivent être testées avant l'utilisation de nouveaux numéros de lots de colorants et de réactif décolorant puis au moins chaque semaine. En cas de résultats de contrôle de qualité aberrants, ne pas fournir les résultats des patients.

LIMITES
1. Tester les contrôles positifs et négatifs avec chaque nouveau numéro de lot de colorants et, une fois par semaine par la suite, pour vérifier l'efficacité des réactifs et s'assurer que la procédure de décoloration est réalisée adéquatement.[5]
2. Pour obtenir les résultats les plus fiables, retirer les isolats des prélèvements d'une culture de 18-24 h poussant sur un milieu non sélectif.[5]
3. Ne pas surchauffer les frottis au moment de les fixer sur les lames. Une chaleur excessive provoque une coloration atypique.[5,6]
4. Les organismes à Gram positif contenus dans un prélèvement risquent de se révéler négatifs si le patient suit un traitement antimicrobien.[5]
5. Le cristal violet précipité peut prendre une forme coccoïde ou l'apparence d'élements fongiques, mais aussi d'autres artéfacts ou matériaux d'arrière-plan.[5]

BIBLIOGRAPHIE

1. Bartholomew, J.W. and T. Mittwer. 1952. Bacteriol. Rev. 16:1-29.
2. Mittwer, T., J.W. Bartholomew, and B.J. Kallman. 1950. Stain Technol. 25:169-179.
3. Bartholomew, J.W. and T. Mittwer. 1951. Stain Technol. 26:231-240.
4. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2007. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Mosby Elsevier, St. Louis, MO.
5. Garcia, L.S. 2010. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3rd ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. Mangels, J.I., M.E. Cox, and L.H. Lindberg. 1984. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2:129-137.

CONDITIONNEMENT

REF R40052, Gram Crystal Violet	250 ml/flacon
REF R40053, Gram Crystal Violet	250ml/flacon, 5/paquet
REF R40073, Gram Crystal Violet	Gallon

Légende des Symboles

REF	Numéro de référence
IVD	Dispositif médical de diagnostic *in vitro*
LAB	Pour l 'usage de laboratoire
	Lire les instructions avant utilisation (IFU = mode d'emploi)
	Limites de température (stockage)
LOT	Code de lot (numéro)
	À utiliser avant le (date de péremption)
EC REP	Représentant autorisé pour l'UE
	Fabricant

12076 Santa Fe Drive
Lenexa, KS 66215, USA
www.remel.com
(800) 255-6730
International: (913) 888-0939

EC REP Remel Europe Ltd.
Clipper Boulevard West, Crossways
Dartford, Kent, DA2 6PT
UK

Pour tout support technique, contacter le distributeur local.

CAS (numéro de registre CAS)
Fabriqué pour Remel Inc.

IFU 40052, révisée le 2014-01-03 Imprimé aux États-Unis

remel

Gram Crystal Violet (Italiano)

USO PREVISTO
Il Cristal violetto di Gram Remel è un reagente consigliato per l'uso nelle procedure qualitative allo scopo di differenziare gli organismi gram-negativi da quelli gram-positivi.

DESCRIZIONE DEL PRODOTTO
Il metodo di colorazione di Gram fu sviluppato nel 1884 dal batteriologo danese Christian Gram, allo scopo di differenziare le cellule batteriche dal tessuto infetto.[1] Successivamente fu scoperto che la composizione della parete cellulare batterica era la chiave per la colorazione di Gram e che avrebbe differenziato i batteri in due gruppi in base al colore delle cellule dopo la colorazione. Da allora, sono state eseguite molte modifiche alla tecnica originale.[2,3]

PRINCIPIO
La colorazione primaria è il cristal violetto, un colorante basico assorbito da tutti i batteri a causa della sua capacità di penetrare rapidamente nella parete cellulare. Esso colora di porpora il protoplasto dei batteri. La miscela di potassio-iodio è il mordente che forma un complesso con la colorazione primaria nelle cellule. Nelle cellule gram-positive, il complesso viola cristallo-iodio viene catturato nelle cellula a causa di una diminuzione di permeabilità della parete cellulare, provocata dalla disidratazione dell'alcol. Pertanto le cellule gram-positive si colorano di porpora. Nelle cellule gram-negative, il complesso viene rimosso dal decolorante a causa di un aumento di permeabilità provocato dalla solubilità dei lipidi nell'alcol. Il colorante di contrasto utilizzato deve essere di un colore contrastante la colorazione primaria e, in questo caso, si tratta di safranina che colora di rosso le cellule gram-negative.

REAGENTI (FORMULA CLASSICA)*

Cristal violetto (CAS 548-62-9)	20,0	g
Ossalato di ammonio (CAS 6009-70-7)	8,0	g
Alcol etilico al 95% (CAS 64-17-5)	200,0	ml
Acqua demineralizzata (CAS 7732-18-5)	800,0	ml

*La formulazione è regolata in base ai criteri di performance richiesti.

PRECAUZIONI
Avvertenza! Liquido e vapore infiammabili. Può causare irritazione a occhi, cute e vie respiratorie. Può causare depressione del sistema nervoso centrale. Può causare danni al fegato e ai reni. Può causare effetti riproduttivi e avere ripercussioni sul feto. Le proprietà tossicologiche di questo materiale non sono state del tutto analizzate.

Il prodotto è indicato esclusivamente per uso diagnostico *in vitro* e deve essere utilizzato solo da personale competente ed esperto. Si raccomanda di adottare le dovute precauzioni contro eventuali rischi microbiologici, sterilizzando opportunamente dopo l'uso campioni, contenitori e terreni di coltura. Leggere con attenzione le istruzioni contenute in questo documento e attenervisi scrupolosamente. Per ulteriori informazioni consultare la Scheda di Sicurezza del prodotto.

CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE
Questo prodotto è pronto per l'uso e non necessita di ulteriore preparazione. Conservare il prodotto nel contenitore originale ad una temperatura pari a 20-25°C fino al momento dell'utilizzo.

DETERIORAMENTO DEL PRODOTTO
Questo prodotto non deve essere usato se (1) il colore non è più porpora, (2) è trascorsa la data di scadenza o (3) sono presenti altri segni di deterioramento.

PRELIEVO, CONSERVAZIONE E TRASPORTO DEI CAMPIONI
Prelevare e trattare i campioni attenendosi alle linee guida raccomandate.[4,5]

MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO
(1) Dispositivo di sterilizzazione per anse, (2) ansa per inoculo, tamponi, contenitori di prelievo, (3) termostato o sistemi per la formazione di atmosfere modificate, (4) terreni di coltura supplementari, (5) Organismi per il controllo qualità, (6) iodio Gram (R40056), (7) decolorante Gram (R40054), (8) safranina Gram (R40058), (9) vetrini, (10) becco di Bunsen o riscaldatore per vetrini, (11) microscopio, olio di immersione, (12) rack per colorazione, (13) metanolo (opzionale).

PROCEDIMENTO
1. Eseguire uno striscio sottile del materiale per lo studio sul vetrino. Lasciare asciugare completamente all'aria il vetrino oppure utilizzare un riscaldatore per vetrini. Fissare il vetrino, passandolo 3 o 4 volte attraverso la fiamma di un becco di Bunsen oppure irrigare lo striscio con metanolo e lasciarlo evaporare.
2. Posizionare il vetrino su un rack per colorazione e coprirlo con Cristal violetto di Gram per 1 minuto.
3. Lavarlo completamente con acqua e coprirlo con il mordente di iodio Gram per 1 minuto.
4. Irrigare con il decolorante Gram, finché il solvente non scorre privo di colorazione dal vetrino (10-30 secondi).
5. Sciacquare con acqua e coprire con safranina Gram per 30 secondi.
6. Sciacquare con acqua e lasciare asciugare.

INTERPRETAZIONE
Gli organismi gram-positivi si colorano di porpora.
Gli organismi gram-negativi si colorano di rosso.

CONTROLLO QUALITÀ
Tutti i numeri di lotto di Gram Crystal Violet sono stati esaminati ed è stato riscontrato che forniscono risultati di colorazione accettabili, come quelli elencati nella sezione **Interpretazione**. I vetrini di controllo positivo e negativo devono essere esaminati prima di utilizzare nuovi numeri di lotto di colorante e di reagente decolorante e almeno una volta a settimana dopo l'utilizzo. Se i test di controllo qualità forniscono risultati aberranti, i risultati ottenuti con i campioni in esame non devono essere refertati.

LIMITAZIONI
1. Esaminare i controlli positivi e negativi con ogni nuovo numero di lotto di colorazioni e, settimanalmente, verificare l'efficacia e controllare che la procedura di decolorazione venga eseguita correttamente.[5]
2. Per ottenere risultati più affidabili, rimuovere gli isolati di campione clinico da una coltura di 18-24 ore in crescita su un terreno non selettivo.[5]
3. Durante il fissaggio dei vetrini non surriscaldare gli strisci. Un riscaldamento eccessivo darà luogo ad una colorazione atipica.[5,6]
4. Gli organismi gram-positivi contenuti in un campione possono apparire gram-negativi, se il paziente sta seguendo una terapia antimicrobica.[5]
5. Il cristalvioletto precipitato può apparire come forme coccoidi o elementi fungini, nonché come artefatti o materiale di sfondo di altra natura.[5]

BIBLIOGRAFIA

1. Bartholomew, J.W. and T. Mittwer. 1952. Bacteriol. Rev. 16:1-29.
2. Mittwer, T., J.W. Bartholomew, and B.J. Kallman. 1950. Stain Technol. 25:169-179.
3. Bartholomew, J.W. and T. Mittwer. 1951. Stain Technol. 26:231-240.
4. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2007. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Mosby Elsevier, St. Louis, MO.
5. Garcia, L.S. 2010. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3rd ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. Mangels, J.I., M.E. Cox, and L.H. Lindberg. 1984. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2:129-137.

CONFEZIONE

REF R40052, Gram Crystal Violet	flacone da 250 ml
REF R40053, Gram Crystal Violet	flacone da 250 ml, 5 per confezione
REF R40073, Gram Crystal Violet	3,8 L ca.

Legenda dei Simboli

REF	Codice numero
IVD	Dispositivo per uso diagnostico in vitro
LAB	Per uso in laboratorio
	Consultare le istruzioni per l'uso (IFU)
	Limitazioni per temperatura (Temp. di conservazione)
LOT	Codice lotto (Numero Lotto)
	Da utilizzare entro (data di scadenza)
EC REP	Rappresentante autorizzato per l'Europa
	Fabbricante

12076 Santa Fe Drive
Lenexa, KS 66215, USA
www.remel.com
(800) 255-6730
International: (913) 888-0939

EC REP
Remel Europe Ltd.
Clipper Boulevard West, Crossways
Dartford, Kent, DA2 6PT
UK

Per l'assistenza tecnica, rivolgersi al distributore di zona.

CAS (Numero del registro del Chemical Abstract Service)
Prodotto per Remel Inc.

CE

IFU 40052, data ultima revisione: 2014-01-03 Stampato in U.S.A.

remel

GRAM CRYSTAL VIOLET (Español)

USO PREVISTO
El violeta cristal de Gram de Remel es un reactivo de uso recomendado en procedimientos cualitativos para diferenciar entre microorganismos gram-negativos y grampositivos.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN
El método de tinción de Gram fue desarrollado en 1884 por el bacteriólogo danés Christian Gram para diferenciar células bacterianas de tejido infectado.[1] Posteriormente, se descubrió que la clave de la tinción de Gram estaba en la composición de la pared de las células bacterianas y que era posible diferenciar las bacterias en dos grupos según el color de las células después de la tinción. Desde entonces se han realizado numerosas modificaciones en la técnica original.[2,3]

PRINCIPIO DEL ENSAYO
La tinción principal es violeta cristal, un colorante básico absorbido por todas las bacterias debido a su capacidad de permear rápidamente en la pared celular. Tiñe el protoplasto de la bacteria de color morado. La mezcla de potasio y yodo es el mordiente que se combina con la tinción principal en la célula. En las células grampositivas, el complejo violeta cristal-yodo queda atrapado en ellas debido a una reducción en la permeabilidad de la pared celular causada por la deshidratación con alcohol. Las células grampositivas se tiñen de color morado. En las células gramnegativas, el complejo es eliminado por el decolorante debido a un aumento en la permeabilidad causado por la solubilidad de los lípidos en alcohol. La contratinción utilizada debe ser un color que contraste con la tinción principal. En este caso se utiliza safranina, que tiñe las células gramnegativas de color rojo.

REACTIVOS (FÓRMULA CLÁSICA)*

Violeta cristal (CAS 548-62-9)	20.0	g
Oxalato de amonio (CAS 6009-70-7)	8.0	g
Alcohol etílico al 95% (CAS 64-17-5)	200.0	ml
Agua desmineralizada (CAS 7732-18-5)	800.0	ml

*Ajustado según necesidades para cumplir los estándares de comportamiento.

PRECAUCIONES
¡Advertencia! Líquido y vapor inflamables. Puede irritar los ojos, la piel y las vías respiratorias. Puede producir depresión del sistema nervioso central. Puede producir daño hepático y renal. Puede tener efectos nocivos en la reproducción y el feto. Aún no se han investigado en profundidad las propiedades toxicológicas de este material.

Este producto es para uso diagnóstico *in vitro* y debe ser utilizado por personal con la formación adecuada. Deben tomarse precauciones frente a los riesgos microbiológicos, esterilizando correctamente las muestras, envases y medios después de su uso. Se deben leer y seguir atentamente las instrucciones. Consultar más información en la Hoja de Datos de Seguridad del Material.

ALMACENAMIENTO
Este producto se presenta listo para su uso y no requiere más preparación. Almacene el producto en su envase original a una temperatura de 20-25°C hasta el momento de su uso.

DETERIORO DEL PRODUCTO
Este producto no se debe usar si (1) el color ha cambiado y ya no es morado, (2) se ha sobrepasado la fecha de caducidad o (3) hay otros signos de deterioro.

OBTENCIÓN, ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE DE MUESTRAS
Las muestras se deben obtener y manipular acorde con las directivas recomendadas.[4,5]

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS
(1) Asa para esterilización, (2) asa de inoculación, torundas y envases para recogidas, (3) incubadoras, sistemas ambientales alternativos, (4) medios complementarios, (5) Microorganismos de control de calidad, (6) yodo de Gram (R40056), (7) decolorante de Gram (R40054), (8) safranina de Gram (R40058), (9) portaobjetos de vidrio, (10) mechero de Bunsen o calentador de portaobjetos, (11) microscopio, aceite de inmersión, (12) gradilla de tinción, (13) metanol (opcional).

PROCEDIMIENTO
1. Prepare un frotis delgado del material de estudio sobre un portaobjetos de vidrio. Deje que el portaobjetos se seque al aire completamente o utilice un calentador de portaobjetos. Fije el portaobjetos pasándolo 3 ó 4 veces por la llama de un mechero de Bunsen o empape el frotis con metanol y deje que se evapore.
2. Coloque el portaobjetos sobre una gradilla de tinción y cubra con violeta cristal de Gram durante 1 minuto.
3. Lave bien con agua y cubra con mordiente de yodo de Gram durante 1 minuto.
4. Cubra con decolorante de Gram hasta que el disolvente fluya incoloro del portaobjetos (de 10 a 30 segundos).
5. Aclare con agua y cubra con safranina de Gram durante 30 segundos.
6. Aclare con agua y deje secar.

INTERPRETACIÓN
Los microorganismos grampositivos se tiñen de color morado.
Los microorganismos gramnegativos se tiñen de color rojo.

CONTROL DE CALIDAD
Todos los números de lote de Gram Cristal Violeta se han analizado y se ha determinado que ofrecían resultados de tinción aceptables, según se indica en la sección **Interpretación**. Los portaobjetos de control positivo y negativo deben analizarse antes de usar los nuevos números de lote de tinciones y de reactivo decolorante, y al menos una vez a la semana en lo sucesivo. Si se observan resultados anómalos en el control de calidad, no deben comunicarse los resultados del paciente.

LIMITACIONES
1. Pruebe el control positivo y el control negativo cada vez que reciba un lote nuevo de tinción y, posteriormente, de forma semanal para comprobar la eficacia del reactivo y asegurarse de realizar correctamente el procedimiento de decoloración.[5]
2. Para obtener los resultados más fiables, retire los inóculos de muestras clínicas de un cultivo de 18 a 24 horas en un medio no selectivo.[5]
3. No caliente los frotis de forma excesiva cuando fije los portaobjetos. El calor excesivo producirá una tinción atípica.[5,6]
4. Los microorganismos grampositivos contenidos en una muestra pueden parecer gramnegativos si el paciente está recibiendo terapia antimicrobiana.[5]
5. Puede aparecer violeta de metilo precipitado con forma de coco o elementos fúngicos, así como otros artefactos o material de fondo.[5]

BIBLIOGRAFÍA

1. Bartholomew, J.W. and T. Mittwer. 1952. Bacteriol. Rev. 16:1-29.
2. Mittwer, T., J.W. Bartholomew, and B.J. Kallman. 1950. Stain Technol. 25:169-179.
3. Bartholomew, J.W. and T. Mittwer. 1951. Stain Technol. 26:231-240.
4. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2007. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Mosby Elsevier, St. Louis, MO.
5. Garcia, L.S. 2010. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3rd ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. Mangels, J.I., M.E. Cox, and L.H. Lindberg. 1984. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2:129-137.

PRESENTACIÓN

REF R40052, Gram Crystal Violet	250 ml/frasco
REF R40053, Gram Crystal Violet	250 ml/frasco, 5 unidades/envase
REF R40073, Gram Crystal Violet	Galón

Símbolos

REF	Número de catálogo
IVD	Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*
LAB	Para uso en laboratorio
	Consultar las instrucciones de uso (IFU)
	Límite de temperatura (de almacenamiento)
LOT	Código de lote (número de lote)
	Fecha de caducidad
EC REP	Representante autorizado en Europa
	Fabricante

12076 Santa Fe Drive
Lenexa, KS 66215, USA
www.remel.com
(800) 255-6730
International: (913) 888-0939

EC REP
Remel Europe Ltd.
Clipper Boulevard West, Crossways
Dartford, Kent, DA2 6PT, UK

CE

Para obtener asistencia técnica póngase en contacto con su distribuidor local.

CAS (Nº del Chemical Abstracts Service Registry)
Fabricado para Remel Inc.

IFU 40052, Revisado el 2014-01-03 Impreso en los EE.UU.